

ICS 11.060.10

CCS C 33

备案号：



中华人民共和国国家标准化指导性技术文件

GB/Z ××××—××××

# 牙科学 医疗器械脱落或释放纳米颗粒体外细胞毒性评价 细胞周期同步化方法

Dentistry - In Vitro Cytotoxicity Test of Nanoparticles Released or Detached from  
Medical Devices Using Cell Cycle Synchronization Model

(征求意见稿)

××××-××-××发布

国家市场监督管理总局  
国家标准化管理委员会

## 目 录

目 录	I
前 言	I
引 言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语与定义	1
4 缩略语	1
5 总则	2
6 原理	2
7 仪器与试剂	2
8 试验方法	3
9 试验过程	3
10 数据记录与分析	7
11 接受准则	8
12 结果评定	8
13 试验报告	9

## 前 言

本文件为规范类指导性技术文件。

本文件按照 GB/T 1.1《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国口腔材料和器械设备标准化技术委员会（SAC/TC 99）归口。

本文件起草单位：北京大学口腔医学院口腔医疗器械检验中心、北京大学口腔医院、北京大学、国家纳米科学中心

本文件主要起草人：邓旭亮、张学慧、卫彦、徐明明、郭雨思、柴媛、游富平、孟幻、刘颖、江瑞宁、张金

## 引 言

在纳米口腔医疗器械在使用过程中可能脱落或释放纳米颗粒，并且具有潜在风险。

针对脱落及释放纳米颗粒的安全性评估尤为重要。为了更加准确评估这些纳米颗粒的细胞毒性，本文件采用细胞周期同步化模型，并结合 MTT 法进行细胞毒性检测。

将细胞周期同步化之后，利用 MTT 法检测口腔医疗器械脱落或释放的纳米颗粒对细胞的毒性作用。通过此方法，旨在揭示纳米颗粒对细胞生长、代谢的影响，为口腔医疗器械的安全使用提供科学依据。

# 牙科学 医疗器械脱落或释放纳米颗粒体外细胞毒性评价 细胞周期同步化方法

## 1 范围

本文件规定了口腔医疗器械脱落或释放纳米颗粒对同步化细胞体外细胞毒性的评价方法。

本文件适用于口腔纳米医疗器械和存在纳米颗粒脱落或释放可能的口腔医疗器械体外细胞毒性评价。脱落或释放其他形状纳米材料的口腔医疗器械也可以参考本文件。

本文件不适用于不含纳米颗粒的口腔医疗器械或无纳米颗粒脱落或释放可能的口腔医疗器械。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 16886.1 医疗器械生物学评价 第1部分：风险管理过程中的评价与试验

GB/T 16886.5 医疗器械生物学评价 第5部分：体外细胞毒性试验

GB/T 16886.12 医疗器械生物学评价 第12部分：样品制备与参照材料

YY/T 0993 医疗器械生物学评价 纳米材料：体外细胞毒性试验（MTT试验和LDH试验）

## 3 术语与定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1 纳米颗粒 nanoparticles

指至少在一个维度上尺寸处于纳米尺度（1-100纳米）范围内的颗粒。这些颗粒可以是自然界中存在的，也可以是通过工程化方法人工合成的。

### 3.2 细胞周期同步化 cell cycle synchronization

利用物理或化学手段诱导非异步生长的细胞群体，使其共同处于细胞周期的某一特定阶段（如G0/G1期、S期或G2/M期）的技术。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

APAP：对乙酰氨基酚（N-acetyl-p-aminophenol / Acetaminophen）

DMSO：二甲基亚砜（Dimethyl sulfoxide）

FBS：胎牛血清（Fetal bovine serum）

HDPE：高密度聚乙烯（High-density polyethylene）

MTT：3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴盐  
[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]

NP：纳米颗粒（Nanoparticles）

PBS：磷酸盐缓冲液（Phosphate buffered saline）

PI：碘化丙啶（Propidium iodide）

## 5 总则

本标准规范了口腔医疗器械脱落或释放纳米颗粒的细胞周期同步化体外细胞毒性评价方法，通过将同步化细胞的毒性检测结果与异步生长细胞对比，精准评价纳米颗粒对不同细胞周期阶段细胞的毒性差异及特定周期毒性敏感性，实现对口腔纳米医疗器械及潜在释放纳米颗粒的口腔医疗器械细胞毒性的精准、针对性评估，为该类器械的生物学安全性评价和风险管理提供科学、统一的试验方法与判定依据。

## 6 原理

本方法基于不同细胞周期阶段对口腔医疗器械释放/脱落纳米颗粒的敏感性差异，通过特定的诱导手段（如营养限制或化学拦截）使细胞群体处于一致的生长阶段（细胞周期同步化）。

建立同步化模型后，将细胞暴露于含有目标纳米颗粒的浸提液或悬浮液中。通过评估细胞的代谢活性、增殖能力或形态学变化，定量评价纳米颗粒在特定细胞周期下的体外细胞毒性。

注：同步化效果通过细胞周期分析（如DNA含量测定）进行验证，确保试验起始时目标期细胞比例具有统计学意义。

## 7 仪器与试剂

### 7.1 仪器

- 7.1.1 微孔板分光光度计（酶标仪）
- 7.1.2 可放置96孔板的离心机
- 7.1.3 CO<sub>2</sub>细胞培养箱
- 7.1.4 恒温水浴槽
- 7.1.5 倒置显微镜
- 7.1.6 可放置96孔板的振荡器
- 7.1.7 加样器
- 7.1.8 流式细胞仪
- 7.1.9 超声波破碎仪/超声波清洗机
- 7.1.10 分析天平（精度0.01mg）
- 7.1.11 自动细胞计数仪/血球计数板

### 7.2 试剂

- 7.2.1 MTT
- 7.2.2 对乙酰氨基酚（APAP）
- 7.2.3 二甲基亚砜（DMSO）
- 7.2.4 甘氨酸（Glycine）
- 7.2.5 氯化钠（NaCl）
- 7.2.6 氢氧化钠（NaOH）
- 7.2.7 细胞培养液
- 7.2.8 胎牛血清（FBS）
- 7.2.9 磷酸盐缓冲液（PBS）
- 7.2.10 青霉素-链霉素混合溶液（Penicillin-Streptomycin, PS）
- 7.2.11 含乙二胺四乙酸（EDTA）的胰蛋白酶（Trypsin）
- 7.2.12 乙醇（ethanol）

7.2.13 PI染色液

7.2.14 核糖核酸酶 A (RNase A)

### 7.3 耗材

7.3.1 96孔平底细胞培养板

7.3.2 细胞冻存管

7.3.3 培养瓶

7.3.4 流式细胞术配套耗材 (如上机管)

7.3.5 离心管

7.3.6 低蛋白吸附枪头

7.3.7 0.22 μm 滤器 (除菌滤膜)

## 8 试验方法

### 8.1 MTT细胞毒性检测

本试验是将纳米材料稀释液或纳米材料医疗器械的浸提液接触培养细胞周期同步化后的细胞,通过MTT评价对细胞线粒体的毒性作用和对细胞膜的毒性作用。

MTT试验: MTT是一种黄色的水溶性四氮唑染料,可被活细胞还原为紫色非水溶性甲瓚。MTT试验是用二甲基亚砜(DMSO)溶解甲瓚,并通过微孔板分光光度计(酶标仪)定量甲瓚,对比试验组和对照组的吸光值,评估测试样品细胞毒性的方法。

### 8.2 细胞系

#### 8.2.1 常用细胞系

可参照 GB/T 16886.5 选择细胞系,推荐使用 L929 细胞。也可根据产品的使用部位和特点选择其他能得出相同或更佳结果的细胞系,但需经过验证,证明其反应的重现性和准确性。

#### 8.2.2 行业相关细胞(可选)

根据口腔医疗器械的应用部位和预期接触组织,宜选择具有代表性的细胞进行试验,例如,口腔粘膜相关细胞:如人牙龈成纤维细胞(HGFs)、人牙龈上皮细胞(HGEs);硬组织相关细胞:如骨髓间充质干细胞(BMSCs)、成骨细胞(MC3T3-E1);牙髓相关细胞:如人牙髓干细胞(DPSCs)。

#### 8.2.3 靶器官细胞

若器械释放的纳米颗粒可能通过全身循环进入靶器官,可参照 ASTM E2526 选择特定细胞系,如:肝脏靶向:人肝癌细胞(HepG2);肾脏靶向:猪近曲小管上皮细胞(LLC-PK1)。

#### 8.2.4 细胞准备

采用处于对数生长期的细胞。若使用冻存细胞,试验前至少传代 2~3 次,以确保细胞生理状态稳定。细胞同步化前的初始细胞活力不低于 90%。

### 8.3 培养液

可参照 GB/T 16886.5 保存和使用培养液,符合选定细胞或细胞系的生长条件。

## 9 试验过程

### 9.1 样品准备

#### 9.1.1 试验样品准备

### 9.1.1.1 样本浸提原则

参照GB/T 16886.12制备浸提液：

- a) 按照 GB/T 16886.12 规定的表面积比（或体积/重量比）取材，选取包含纳米材料在内的成品医疗器械部分进行浸提。同时考虑医疗器械表面纳米颗粒的负载量、分布及形态特性，必要时可根据纳米颗粒的暴露面积或含量调整浸提比例或条件，以充分提取可脱落的纳米颗粒，用于后续细胞毒性评价；
- b) 也可根据材料特点选择质量比取材。

### 9.1.1.2 浸提介质

浸提介质的选择参照GB/T 16886.5和GB/T 16886.12。细胞毒性试验首选使用含血清的培养基，也可选用以下极性与非极性浸提介质：

极性浸提介质：水、生理盐水、无血清培养基

非极性浸提介质：符合各国药典质量规定的新鲜精制植物油（如棉籽油、芝麻油）

**注：**不同的浸提介质可能会影响纳米颗粒的表面特性，如：颗粒的大小、颗粒的聚集特性、表面电荷的变化、蛋白质及其他物质的吸附、离子的释放等，进而影响纳米材料的细胞毒性反应。因此，浸提介质的选择非常重要，宜阐述选择的理由。

### 9.1.1.3 浸提条件

浸提条件可参照GB/T 16886.12。对于长期（24h~30d）或持久接触（>30d）的医疗器械，细胞毒性试验的浸提时间建议为72h，推荐的浸提条件为（37±1）℃下不少于24h。

在非必需情况下，浸提液无需过滤，把从含纳米颗粒的口腔医疗器械中浸提出的含纳米颗粒和离子的浸提液用于试验；如果进行过滤、离心或其他处置方法，在最终报告中予以说明。对浸提液pH的调整也在报告中说明。

**注1：**宜避免对浸提液进行处理，例如对pH的调整。

**注2：**随着国际纳米毒理学研究的进展和认知水平的提高，鼓励根据试验样品的预期用途和自身特性选择更合适的浸提条件。

### 9.1.1.4 试验样品稀释液 / 浸提液的处理

试验样品稀释液或浸提液可通过高压蒸汽灭菌（121℃，9.6 MPa，25 min），或者在 75% 乙醇中浸泡 15 min 后再用去离子水彻底清洗。使用之前，对每批试验样品稀释液 / 浸提液进行微生物培养以确定其无菌性。

## 9.1.2 对照样品的制备

### 9.1.2.1 阳性对照

设置阳性对照以证实试验系统的有效性。

- a) 可选用对乙酰氨基酚（APAP）：用培养液配制适当浓度的溶液（推荐浓度为25 mmol/L），经过滤除菌后待用使用。
- b) 亦可选用其他已知具有稳定细胞毒性的材料。

**注：**粒径明确且具有稳定细胞毒性的纳米颗粒（如特定规格的氧化铝、纳米银或纳米氧化锌颗粒）可作为纳米颗粒细胞毒性评价的候选阳性对照，以便于在相同尺度下比较毒性反应。

### 9.1.2.2 阴性对照

宜选择已知无细胞毒性的材料作为阴性对照，参照 GB/T 16886.12 进行制备。

示例：

—— 高密度聚乙烯（HDPE）：建议作为材料浸提试验的阴性对照；

—— 不锈钢或氧化铝陶瓷：可作为金属/陶瓷类器械的阴性对照；

—— 培养基对照：对于直接暴露试验，可使用未经任何处理的完整培养基作为阴性对照。

需注意：阴性对照产生的细胞反应不超过 1 级（或相对细胞活性 $\geq 70\%$ ）

### 9.1.3 试剂准备

#### 9.1.3.1 MTT试验

9.1.3.1.1 MTT 溶液：用PBS配成 5 mg/mL，4°C避光保存不超过一个月。

9.1.3.1.2 甘氨酸缓冲液：0.1 mol/L 的甘氨酸（Mr75.07），0.1 mol/L氯化钠（Mr58.44）。用0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调整 pH 至10.5，室温下储存。

### 9.1.4 浸提液中纳米颗粒的表征与确认

#### 9.1.4.1 目的

为明确浸提液中颗粒的尺寸分布与理化性质，排除微米级颗粒或其他杂质对细胞毒性测试结果的干扰，试验前对浸提液中颗粒进行鉴定与表征。

#### 9.1.4.2 依据标准

浸提液中颗粒的表征宜参照下列标准和技术文件：

- GB/T 46147《医疗器械生物学评价 纳米颗粒脱落和释放测量 颗粒跟踪分析法》；
- YY/T 1863《纳米医疗器械生物学评价 含纳米银敷料中纳米银颗粒和银离子的释放与表征方法》；
- GB/T 42732《纳米技术 水相中无机纳米颗粒的尺寸分布和浓度测量 单颗粒电感耦合等离子体质谱法》；
- ISO/TR 10993-22 中关于纳米材料表征的相关指南。

#### 9.1.4.3 检测方法

- 粒径及其分布：采用颗粒跟踪分析（PTA）或动态光散射（DLS）测定浸提液中颗粒的粒径分布，以确认纳米颗粒（1 - 100 nm）的主要占比，同时排除微米级颗粒（ $>1 \mu\text{m}$ ）。
- 颗粒数量浓度：通过 PTA 或单颗粒 ICP-MS 测定浸提液中纳米颗粒的数量浓度。
- 形貌及成分：使用透射电子显微镜（TEM）或扫描电子显微镜（SEM）观察颗粒形貌，必要时结合能谱分析（EDS）或 ICP-MS 确定颗粒化学成分。

#### 9.1.4.4 结果判定

- 若浸提液中颗粒以纳米级颗粒为主（ $\geq 80\%$ ），且微米级颗粒占比极低或未检出，则该浸提液可用于后续纳米颗粒细胞毒性试验；
- 若存在较大数量微米级颗粒，则先对浸提液进行过滤、梯度离心或调整浸提条件，以确保试验对象主要为纳米颗粒。

## 9.2 细胞接种与培养

### 9.2.1 细胞接种

将处于对数生长期的细胞按合适的浓度接种于 96 孔板中。

注：同步接种用于细胞周期验证的备用孔或备用板。

### 9.2.2 初始培养

在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 小时，使细胞达到 70%~80% 的汇合度并完全贴壁。

## 9.3 细胞同步化模型建立

### 9.3.1 同步化诱导

根据所选细胞系的生物学特性和生长动力学参数，选择适宜的同步化诱导方案。a) G0/G1期同步

化：宜通过代谢抑制或营养限制（如降低血清浓度）等手段实现。

b) S期及G2/M同步化：用可逆的生物化学拦截手段（如 DNA 聚合酶抑制剂、微管蛋白合成抑制剂等）实现。

注：试验独立设置G0/G1 期、S 期、G2/M 期三组细胞周期同步化试验组，根据各周期诱导技术分别开展同步化处理，同时设置异步生长对照组，不进行任何同步化干预，与各同步化试验组平行培养，其余培养条件完全一致。同步化方案不引入不可逆的细胞损伤，且在去除诱导因素后，细胞能恢复正常的生长周期。

### 9.3.2 同步化效果验证

完成同步化诱导后，立即随机抽取试验板中的细胞，按8.3.3的方法进行细胞周期检测。只有当各同步化试验组目标期细胞比例显著高于异步生长对照组，并达到预期指标（如G0/G1期、S期或G2/M期比例 $\geq 70\%$ ）时，其余试验孔方可进入加样环节。

### 9.3.3 细胞周期检测方法

采用流式细胞术或其他经验证的方法，对同步化后的细胞周期分布进行分析。

a) 样品制备：收集同步化处理后的受试细胞，经洗涤、固定（如使用 70% 乙醇）或通透化处理，利用 DNA 特异性荧光染料（如碘化丙啶 PI 等）进行标记。

b) 检测操作：使用流式细胞仪检测各组细胞的 DNA 含量分布。检测过程中排除细胞碎片和粘连细胞的干扰。

c) 数据处理：采用配套软件对 DNA 含量直方图进行拟合分析，分别计算处于G0/G1期、S期和G2/M期的细胞百分比。

## 9.4 样品加样与暴露试验

### 9.4.1 浓度设置原则

#### 9.4.1.1 纳米材料原材料及其分散液

如果试验样品为纳米材料原材料的分散液，或可分散于细胞培养液的样品，则每一种纳米材料或样品需测试 5~7 个不同的浓度（在有剂量-反应关系的范围内进行稀释，并验证试验系统是否有效）。

试验样品为纳米材料原材料时，所配纳米颗粒的最高浓度在其最大可溶性范围内。对于非可溶性金属纳米颗粒，可根据预试验选择最大的毒性浓度为初始浓度（如：细胞生长抑制率在 80%左右）；最小浓度宜获得 10%左右的细胞生长抑制率。

#### 9.4.1.2 含纳米材料医疗器械的浸提液

如果试验样品为含纳米材料医疗器械的浸提液，而且浸提液中纳米材料的含量很低（细胞毒性小于或等于II级），则只需测试浸提液原液，无需稀释；但如果浸提液中纳米材料的含量较高（细胞毒性大于或等于III级），宜稀释 5~7 个不同的浓度。在不同浓度的浸提液稀释液中分别添加 10%FBS 用于试验样品。

注：宜避免对浸提液进行处理，例如对 pH 值的调整。如需要调整 pH 值时宜给出说明。

### 9.4.2 加样与暴露操作

#### 9.4.2.1 加样时机

G0/G1 期、S 期、G2/M 期同步化试验组及异步生长对照组，在完成 8.3.2 规定的同步化效果验证后，立即弃去同步化诱导液，加入含有受试样品（或对照样品）的完整培养基。

#### 9.4.2.2 干扰扣除

每个试验组同时设置无细胞加样对照组（即仅含有培养液与同浓度试验样品的孔），用于扣除纳米颗粒本身对光学检测的干扰；设置空白对照组（即仅加含有培养液的孔），用于扣除检测体系本身的背景噪音。

### 9.4.2.3 培养条件

加样后的 96 孔板置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 环境下持续培养 24 小时（或根据试验设计设定的特定暴露时间）。

## 9.5 检测

### 9.5.1 纳米材料干扰预评估

纳米颗粒可能对 MTT 产生非细胞介导的还原反应或自身具有强烈的吸光度。试验中必须设置无细胞加样对照组（即仅含等体积培养基和试验样品，无细胞），以评估并扣除背景干扰。相关内容可参见 YY/T 0993。

### 9.5.2 暴露终止与显色孵育

9.5.2.1 暴露时间结束后，取出 96 孔板。弃去各孔中的试验样品和对照样品溶液。为减少游离纳米颗粒的干扰，宜用 PBS 轻轻洗涤细胞 1 次~2 次。

9.5.2.2 每孔直接加入 100 μL MTT 工作液（用无血清培养基将 MTT 配制为 1 mg/mL 的终浓度）。

9.5.2.3 将 96 孔板置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中避光孵育 4 h。

### 9.5.3 结晶溶解与吸光度检测

9.5.3.1 孵育结束后，为防止吸走可能脱落的细胞或包裹结晶的纳米颗粒，将 96 孔板在 700 g 下离心 3 min。

9.5.3.2 小心吸出孔内的培养基和 MTT 溶液，避免触碰孔底的蓝紫色甲瓞（Formazan）结晶。

9.5.3.3 每孔加入 100 μL 二甲基亚砜（DMSO）以溶解结晶。

9.5.3.4 （参考 YY/T 0993）每孔添加 25 μL 甘氨酸缓冲液（0.1 mol/L，pH 10.5），以调节体系 pH 值，稳定吸光度。

9.5.3.5 将 96 孔板置于微量振荡器上室温避光混匀 10 min，确保结晶完全溶解。

9.5.3.6 使用酶标仪检测各孔的吸光度。检测波长设定为 570 nm，参考波长设定为 650 nm ~ 680 nm（如 680 nm）。

## 10 数据记录与分析

### 10.1 数据记录

将 G0/G1 期、S 期、G2/M 期各同步化试验组，及阳性对照、阴性对照、异步生长对照组，均各设置 5 个重复孔。全部测试结果以表格形式记录。在计算时，每个孔的吸光值需要扣除其相应的无细胞加样组的吸光值作为该孔的最终吸光值。

需要计算每个阳性对照、阴性对照和试验样品吸光值的平均值、标准差（SD）以及变异系数（CV）。

### 10.2 计算方法

相对细胞活性 C 按式（1）计算：

$$C = \frac{A_{\text{test}} - A_{\text{NP-blank}}}{A_{\text{ctrl}} - A_{\text{blank}}} \times 100\% \quad \text{式（1）}$$

式中：

$A_{\text{test}}$  —— 试验样品组平均吸光度；

$A_{\text{NP-blank}}$  —— 对应浓度的无细胞加样对照组平均吸光度；

$A_{\text{ctrl}}$  —— 溶剂对照组（细胞+常规培养基）平均吸光度；

$A_{\text{blank}}$  —— 空白对照组（仅常规培养基）平均吸光度。

注：上述各项 A 值均为（检测波长  $OD_{570}$  - 参考波长  $OD_{680}$ ）后的双波长校准值。

### 10.3 结果分析

10.3.1 试验同时设置异步生长对照组。通过对比同步化组与异步组的相对细胞活性，评价受试物对特定细胞周期的毒性敏感性。

10.3.2 试验样品为纳米材料原材料时，由 MTT 试验数据绘制得到浓度-反应曲线。对于所得到的浓度-反应曲线，需要对其反应曲线方程进行非线性拟合，从获得的方程式中计算 IC<sub>50</sub>。

**注：**本文件中 IC<sub>50</sub> 是指 MTT 试验结果中相对细胞活性（相对增殖率）的抑制率达到 50% 时的试验样品浓度。

10.3.3 试验样品为含纳米材料医疗器械的浸提液时，直接报告 9.2 的计算结果（包括平行样或重复孔的平均值±标准偏差）。

## 11 接受准则

### 11.1 试验质量控制

只有满足以下所有条件，本次试验结果方为有效：

- a) 细胞增殖状态：溶剂对照组的吸光度 ( $A_{ctrl} - A_{blank}$ )  $\geq 0.2$ 。
- b) 阳性对照有效性：阳性对照组的相对细胞活性  $\leq 50\%$ 。

### 11.2 细胞毒性判定基准

- a) 毒性阈值：若任一细胞周期阶段某浓度试验组的相对细胞活性  $< 70\%$ ，则判定该浓度的试验样品具有潜在细胞毒性。
- b) 剂量-反应合理性：试验组中低浓度浸提液（如 50% 浓度）的相对细胞活性大于或等于高浓度浸提液（如 100% 原液）。若出现非逻辑的剂量反应倒置，则考虑纳米材料的严重光学干扰或团聚效应，需分析原因并重新试验。
- c) 若某口腔医疗器械脱落纳米颗粒在特定周期表现出较异步组或其他周期更显著的毒性增强或明显降低，结合其对 DNA 复制、氧化应激或纺锤体干扰等机制特性，针对口腔器械接触组织的增殖动态（如高更新频率的牙龈上皮细胞、参与修复改建的牙髓干细胞及牙周膜细胞）进行针对性风险评估；即便异步组试验结果为无毒，亦需警示该材料在组织创伤愈合或炎症等活跃增殖状态下的潜在临床安全性风险。

11.3 若满足 11.1、11.2，则试验可接受，否则重复试验。

**注：**任何被排除的数值（异常值除外）也在报告中说明。

## 12 结果评定

### 12.1 综合评价原则

试验结果结合受试样品的预期临床用途、接触性质及时间，并参考医疗器械风险管理标准（GB/T 16886.1）进行综合评定。

### 12.2 同步化模型的特殊意义

重点评价纳米颗粒对处于特定细胞周期阶段细胞的毒性差异：

——若纳米颗粒在特定周期（如 S 期或 G<sub>2</sub>/M 期）表现出比异步生长细胞更显著的毒性，结合该部位组织细胞的更新频率（如牙龈上皮细胞的快速增殖特性）充分评估其潜在的组织损伤风险；

——同步化模型下的细胞活性变化可作为纳米颗粒干扰细胞周期进展或诱导细胞周期阻滞的辅助性评价指标。

### 12.3 纳米材料理化特性的关联性分析

在解释试验结果时，充分讨论纳米颗粒的物理化学表征（如原始粒径、在培养介质中的动态粒径、表面电荷、团聚/聚散状态、离子释放动力学等）对细胞毒性反应的影响。

### 12.4 细胞毒性后的进一步评估

若试验显示具有细胞毒性，可根据实际情况采取以下措施进行进一步评估：

- a) 条件优化：调整试验系统（如改变血清浓度、调整暴露时间）以模拟更真实的生理环境；
- b) 理化追溯：分析浸提液成分，排除加工残留物、灭菌副产物或离子释放产生的干扰；
- c) 功能性平衡：对于具有抗菌等预期生物功能的纳米材料（如纳米银、纳米氧化锌），权衡其细胞毒性与临床获益，必要时通过动物局部植入试验等进一步观察组织反应。

## 13 试验报告

- a) 试验机构名称和地址；
- b) 试验操作者姓名；
- c) 试验开始和结束日期；
- d) 试样样品和对照样品：包括样品描述、样品处理等；
- e) 细胞系：细胞系选择和细胞来源说明；
- f) 浸提介质、浸提条件、浸提比例；
- g) 介质、血清和抗生素（如添加）的批号和公司名称；
- h) 试验方法和原理；
- i) 阴性、阳性和其他对照品
- j) 细胞反应和其他观察情况；
- k) 结果评定所需的任何其他相关数据。

## 参考文献

- 【1】GB/Z 16886.22 医疗器械生物学评价 第22部分：纳米材料指南
- 【2】GB 17168 牙科学 固定和活动修复用金属材料
- 【3】GB/T 19619 纳米材料术语
- 【4】YY/T 0268 牙科学口腔医疗器械生物学评价第1单元：评价与试验
- 【5】YY/T 0993 医疗器械生物学评价 纳米材料：体外细胞毒性试验（MTT 试验和 LDH 试验）
- 【6】ISO 7405 Dentistry - Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry
- 【7】ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity
- 【8】ISO/TR 10993-22 EN Biological evaluation of medical devices — Part 22: Guidance on nanomaterials
- 【9】赵信义.口腔材料学：第5版[M].北京：人民卫生出版社，2018.
- 【10】Gaspar Banfalvi. Cell Cycle Synchronization: Methods and Protocols. Humana, New York, NY, 2022
- 【11】ASTM E2526 Standard Test Method for Evaluation of Cytotoxicity of Nanoparticulate Materials in Porcine Kidney Cells and Human Hepatocarcinoma Cells
- 【12】GB/T 46147 《医疗器械生物学评价 纳米颗粒脱落和释放测量 颗粒跟踪分析法》；
- 【13】YY/T 1863 《纳米医疗器械生物学评价 含纳米银敷料中纳米银颗粒和银离子的释放与表征方法》；
- 【14】GB/T 42732 《纳米技术 水相中无机纳米颗粒的尺寸分布和浓度测量 单颗粒电感耦合等离子体质谱法》；
- 【15】ISO/TR 10993-22 Biological evaluation of medical devices—Part 22: Guidance on nanomaterials
-